

RIVELAZIONE COLINESTERASICA DEI RESIDUI DI INSETTICIDI ORGANOFOSFORICI E CARBAMMATI

Nell'ambito delle indagini intraprese dall'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Bologna, al fine di mettere a punto una serie di metodi di analisi biologiche e biochimiche per l'individuazione di residui di fitofarmaci e dei loro prodotti di degradazione, nella presente nota si riferisce su alcune ricerche effettuate per controllare la possibilità d'impiego dell'enzima colinesterasico (ChE) quale rivelatore, in cromatografia su strato sottile, di fitofarmaci diversi.

La cromatografia su strato sottile (C.S.S.) con rivelazione enzimatica si ispira, come è noto, principalmente alla cromatografia su carta, con rilevazione «ChE» già descritta da Kovacs e Righi (1963) e da Foschi, Cesari, Olmo (1967). La C.S.S., infatti, ha assunto col passare degli anni una diffusione sempre maggiore come metodo microanalitico per gli innumerevoli vantaggi che essa offre, quali la rapidità, la semplicità di esecuzione, e la estrema sensibilità rispetto ai tradizionali metodi cromatografici.

La tecnica analitica di cui si parla, prevede una prima fase di preparazione degli «strati sottili» ed una seconda fase di rivelazione. Gli strati sottili vengono realizzati come descritto da Menn e Mc. Bain, 1966, mediante stratificatore che consente di ottenere spessori uniformi, di 250 micron, di adsorbente a base di cellulosa MN 300 G (Macherey, Nagel and. Co. Düren, Germany), su piastre di vetro di cm. 20 × 20. Le lastre subiscono poi un'attivazione a 105 °C per 15 minuti. Gli strati così preparati vengono sot-

toposti a lavaggio con una miscela di acqua ed acetone, 1:1 (v/v) quindi lasciati asciugare all'aria a temperatura ambiente e nuovamente attivati a 105 °C per 15 minuti; dopo di che le lastre vengono poste in essiccatori per la conservazione. Dette piastre, prima di essere impiegate, vengono impregnate per eluizione, con una miscela di acetone e formamide nel rapporto 9:1 (v/v) allo scopo di facilitare la separazione e la identificazione dei prodotti. L'eluizione in fase ascendente ed unidimensionale della sostanza da cromatografare, avviene nel nostro caso con Isotano RS (Carlo Erba) entro vasche opportunamente saturate.

La rivelazione consiste nello spruzzare, sulle piastre da cromatografia disposte orizzontalmente, una soluzione, contenente l'enzima «ChE», costituita da siero fresco di sangue di cavallo, acqua distillata, soluzione di idrossido di sodio 0,1 N, bleu di bromotimolo all'1,2% in soluzione di idrossido di sodio 0,1 N nelle seguenti proporzioni: 10:30:1:4 (v/v). Successivamente le lastre, lasciate incubare per 20 minuti a temperatura costante di 25 °C, vengono spruzzate con una soluzione di cloruro di acetilcolina al 2%, come descritto da El Refai ed Hopkins (1965). Trascorsi 20-30 minuti dall'asperzione suddetta, compaiono sulle piastre le caratteristiche macchie di inibizione bleu-verdi su un fondo giallo, che indicano la presenza della sostanza insetticida. Le macchie che si costituiscono, rimangono visibili per un periodo di tempo compreso fra le 2 e le

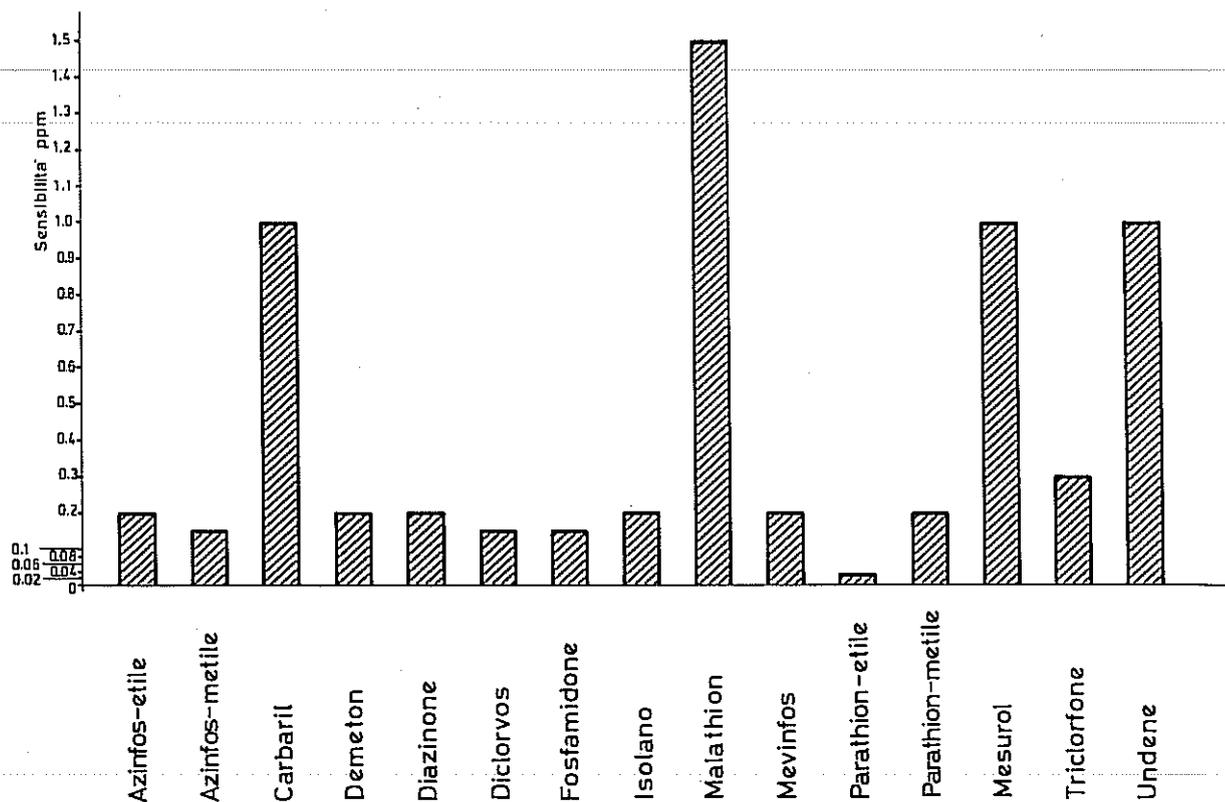


Grafico N. 1 - Rappresentazione grafica dei valori riportati in Tabella N. 3 della sensibilità del test «ChE» ai vari insetticidi.

24 ore, in relazione alla quantità di sostanza attiva antiparassitaria deposta, ed anche alla sua attività inibitrice sulla colinesterasi.

Come è noto la reazione che avviene fra l'enzima «ChE» ed i composti organo-fosforici è legata alla labilità o meno del legame che unisce il fosforo rispettivamente allo zolfo o all'ossigeno. Infatti mentre i derivati dell'acido fosforico e fosfonico, che presentano nella loro costituzione molecolare il legame «P = O» allo stato naturale sono potenti inibitori della colinesterasi, i derivati dell'acido monotiofosforico e ditiofosforico, che presentano un legame «P = S», devono invece essere resi attivi «inibitori» da una preventiva ossidazione.

La tecnica adottata per l'ossidazione già descritta da Cesari, Olmo, Guiati (1967), per la cromatografia su carta, oltretutto consente di differenziare preliminarmente fra loro più antiparassitari presenti nello stesso estratto. Di tale possibilità è dato conto dai

risultati di Tab. 1 (v. cromatogramma n. 1), da cui appare che, nell'ambito dei derivati organofosforici, possono essere rilevati differenzialmente i derivati dell'acido fosforico e dell'acido fosfonico fra cui Diclorvos, Fosfamidone, Mevinfos, Triclorfone, da quelli ditio e monotiofosforici quali Azinfos etile, Azinfos metile, Demeton, Diazinone, Malathion, Parathion etile e metile. Mentre i primi, infatti, vengono rivelati anche senza alcun trattamento particolare, questi ultimi si rivelano solo se sottoposti ad ossidazione. Si è anche constatato che, fra i carbammati insetticidi considerati, il Temik, l'Undene, l'Isolano ed il Metmercapturon, vengono rivelati soltanto se non sottoposti ad ossidazione, mentre il Carbaril si rileva in ogni caso.

La tecnica sopra indicata può, comunque, solo affiancarsi e confortare il sistema di identificazione qualitativo mediante la determinazione dello «Rf» o dello «Rx». Nell'ambito di queste valutazioni è stata svolta una

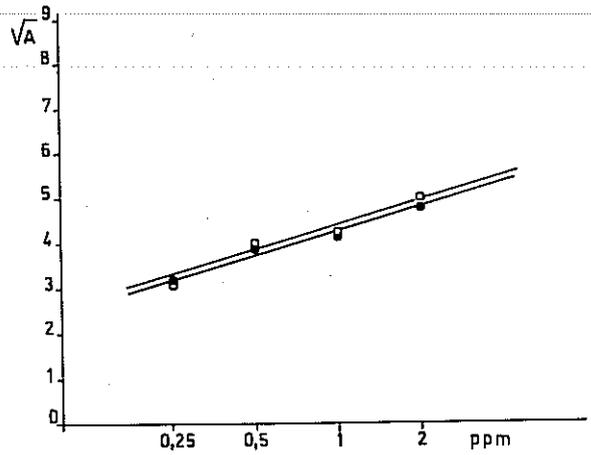
Grafico N. 2 - Rette di regressione ottenute con i risultati riportati in Tabella N. 4 rilevati in cromatografia su strato sottile (C.S.S).

\sqrt{A} = radice quadrata dell'area di inibizione

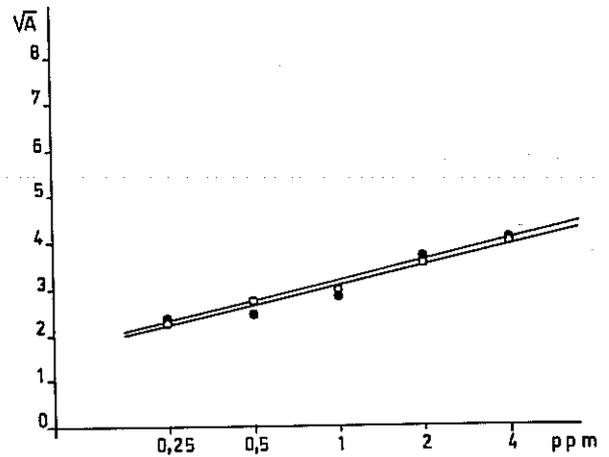
● Standard

○ Estratto

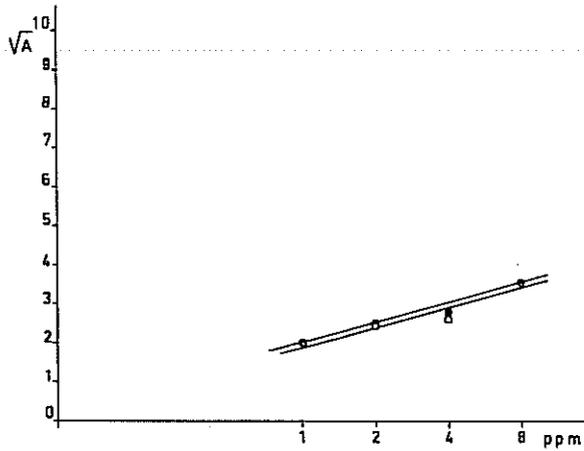
PARATHION



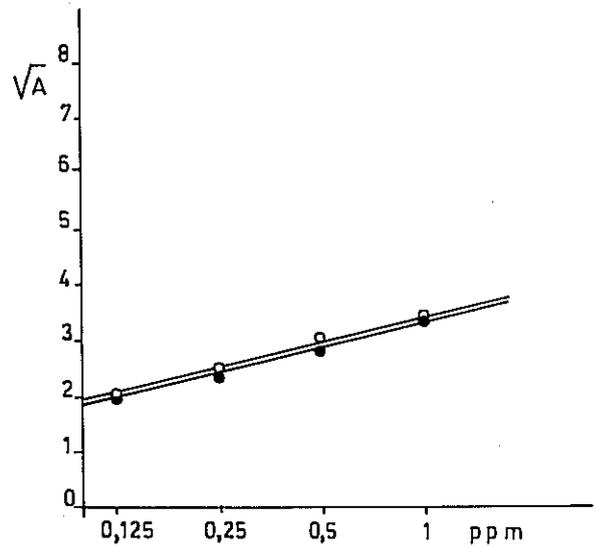
FOSFAMIDONE



CARBARIL



AZINFOS-METILE



DICLORVOS

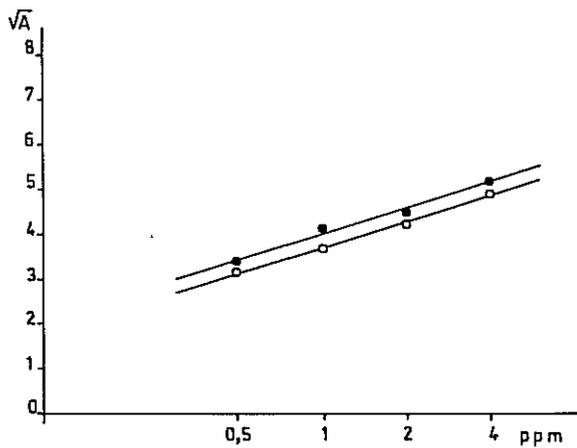


TABELLA N. 1 - Differenziazione dei prodotti organo-fosforici e carbammati insetticidi mediante l'ossidazione

Rivelazione dei preparati			
Con ossidazione	Senza ossidazione	Indifferenti all'ossidazione	Prodotti non rilevabili
Azinfos-etile	Fosfamidone	Carbaril	Demeton-metile
Azinfos-metile	Isolano	Diclorvos	Dimetoato
Demeton	Temik	Fosfamidone	Protoato
Diazinone	Undene	Mevinfos	Tetradifon
Malathion		Triclorfone	
Parathion etile			
Parathion metile			

ricerca su alcuni fitofarmaci allo scopo di determinare la variabilità dello «Rf», per ciascun prodotto, in prove effettuate in tempi diversi. Inoltre per i fitofarmaci considerati è stato determinato anche il valore dello «Rx», coefficiente che è pure impiegato nell'analisi qualitativa su base cromatografica. La determinazione di questo coefficiente (Rx), ha luogo in base al rapporto che si costituisce fra la distanza che intercorre dal fronte di partenza al centro della macchia del prodotto che si vuole ricercare, e la distanza, sempre dal fronte di partenza, al centro di una macchia caratteristica di riferimento, fornita da una preventiva inoculazione, nella lastra cromatografica, di «rosso scarlatto R» in soluzione di cloroformio. In Tab. 2 sono fra loro messi a confronti i valori dello «Rx» e dello «Rf» di diversi insetticidi.

Per la messa a punto del metodo d'analisi di cui si parla è stata condotta una indagine preliminare allo scopo di saggiare la sensibilità del metodo stesso agli insetticidi organofosforici e carbammati. I risultati di tale indagine, elaborati statisticamente mediante l'analisi della regressione e sottoposti alla verifica della linearità sulla base della relazione esistente fra la radice quadrata dell'area della macchia di inibizione ed il logaritmo del peso della sostanza depositata ($\sqrt{A/\log. p.}$), dimostrano (v. Tab. 3 e graf. n. 1) chiaramente la sensibilità che l'enzima «ChE» manifesta nei confronti degli insetticidi organofosforici e carbammati adottando tale metodologia. Essa è di 0,03 p.p.m. per il Parathion etile, ed è compresa fra le 0,15 e 0,30 p.p.m.; rispettivamente per l'Azinfos metile, Diclorvos, Fosfamidone, Azinfos-etile,

TABELLA N. 2 - Ripetibilità de valori «Rf» ed «Rx» di alcuni insetticidi in prove effettuate in tempi diversi

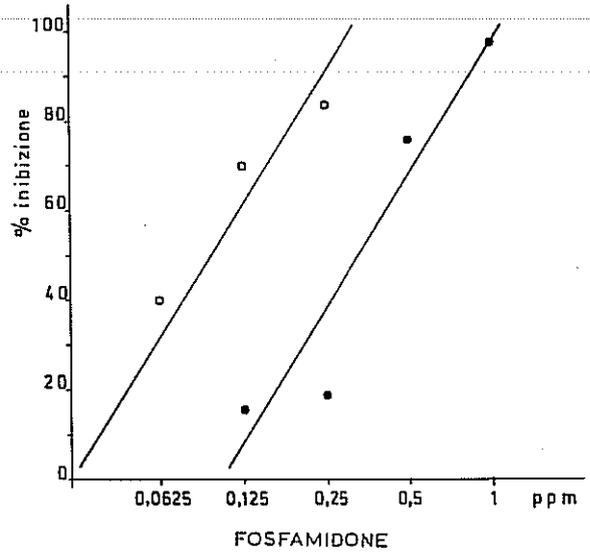
FITOFARMACI	Rf				Media gener.	Errore \pm	Rx				Media gener.	Errore \pm
	Media valori ottenuti in tempi diversi						Media valori ottenuti in tempi diversi					
Carbaril	0,25	0,29	0,25	0,28	0,26	0,006	0,16	0,14	0,17	0,17	0,16	0,007
Diazinone	0,47	0,52	0,48	0,51	0,49	0,010	0,33	0,34	0,33	0,33	0,33	0,002
Diclorvos	0,12	0,15	0,12	0,11	0,12	0,013	0,63	0,67	0,65	0,67	0,65	0,009
Isolano (1° metabolita)	0,14	0,13	0,15	0,16	0,14	0,010	0,30	0,31	0,30	0,30	0,30	0,002
Isolano (2° metabolita)	0,28	0,28	0,32	0,31	0,29	0,011	0,58	0,58	0,59	0,58	0,58	0,002
Mevinfos	0,53	0,58	0,57	0,53	0,55	0,008	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,002
Parathionetile	0,25	0,26	0,21	0,24	0,24	0,010	0,26	0,27	0,26	0,27	0,26	0,002

Grafico N. 3 - Rette di regressione ottenute con i risultati riportati in Tabella N. 4 rilevati con il metodo potenziometrico.

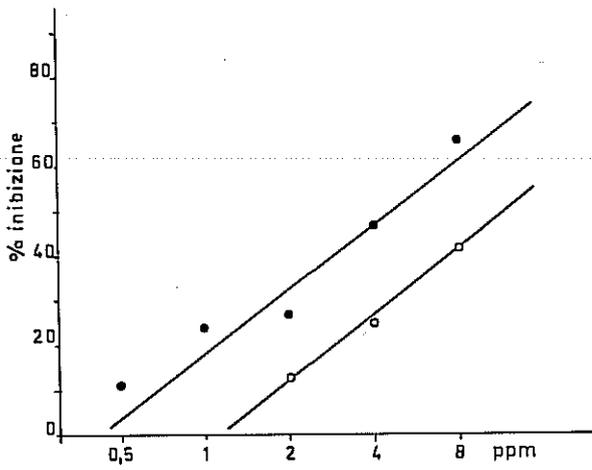
● Standard

○ Estratto

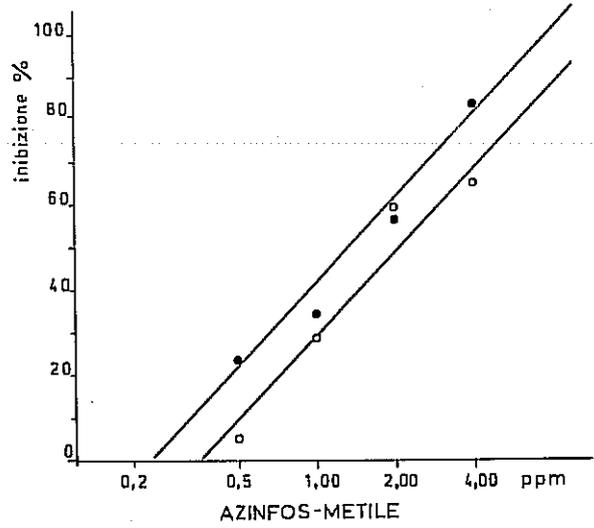
PARATHION



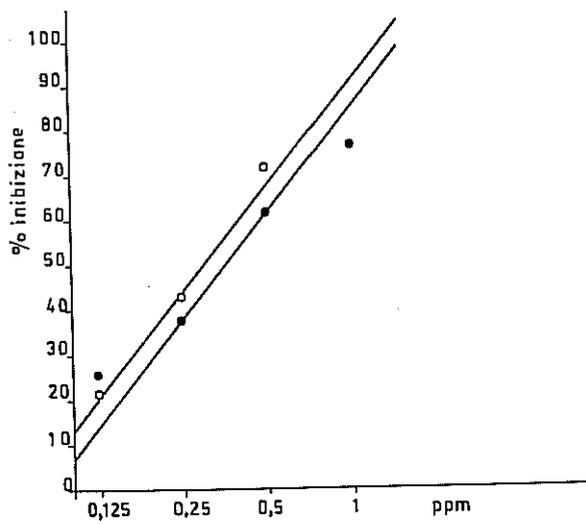
CARBARIL



FOSFAMIDONE



DICLORVOS



AZINFOS-METILE

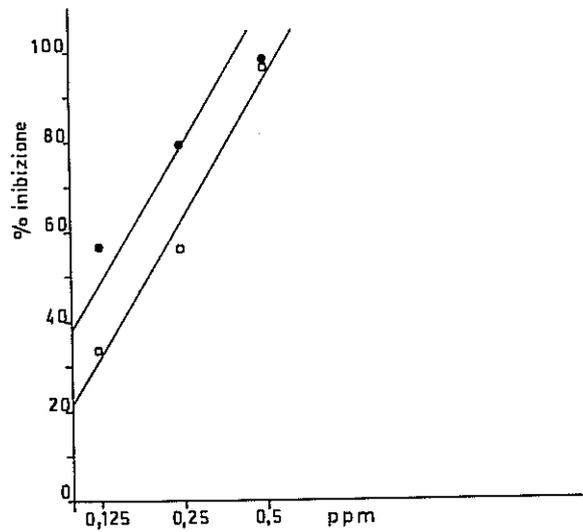


TABELLA N. 3 - Confronto fra la sensibilità manifestata dalla «ChE» in C.S.S. su alcuni insetticidi ed i limiti di tolleranza fissati da C.E.E. e F.A.O.

FITOFARMACI	Limite minimo medio di sensibilità		Limiti di tolleranza	
	ppm	gamma	C.E.E.	F.A.O.
Azinfos-etile	0,20	0,0020	—	0,50
Azinfos-metile	0,15	0,0015	—	0,50
Carbaril	1,00	0,0100	3,00	—
Demeton	0,20	0,0020	—	0,30
Diazinone	0,20	0,0020	0,30	—
Diclorvos	0,15	0,0015	0,50	—
Fosfamidone	0,15	0,0015	—	0,50
Isolano	0,20	0,0020	0,50	—
Malathion	1,50	0,0150	—	3,00
Metmercaptopurone	1,00	0,0100	n.c.	n.c.
Mevinfos	0,20	0,0020	0,50	—
Parathion etile	0,03	0,0003	0,50	—
Parathion metile	0,20	0,0020	0,50	—
Triclorfone	0,30	0,0030	0,50	—
Undene	1,00	0,0100	1,50	—

Demeton, Diazinone, Mevinfos, Parathion metile e Triclorfone. Il Malathion è stato, invece, evidenziato solo ad 1,5 p.p.m.

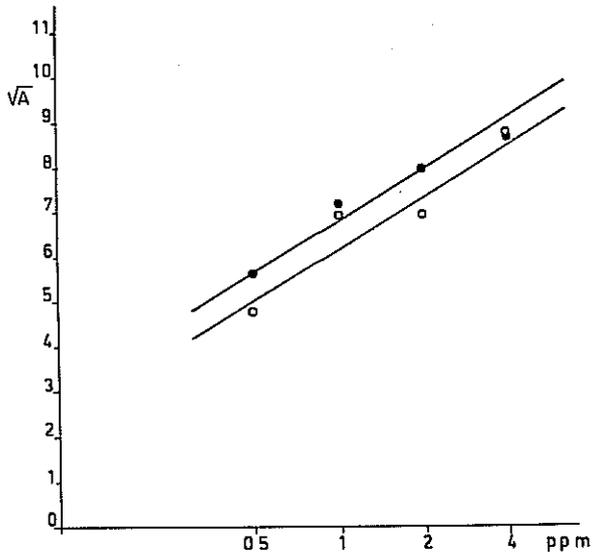
Per i carbammati insetticidi, l'Isolano è stato rilevato a dosi di 0,20 p.p.m. e l'Undene, il Mesurool ed il Carbaril ad 1 p.p.m.

Come si può constatare questo metodo, pur presentando una sensibilità verso i fitofarmaci, variabile con la natura fisico-chimica e la tossicità di ciascun preparato, ha dimostrato di evidenziare quantità di tali fitofarmaci sempre inferiori a quelle fissate

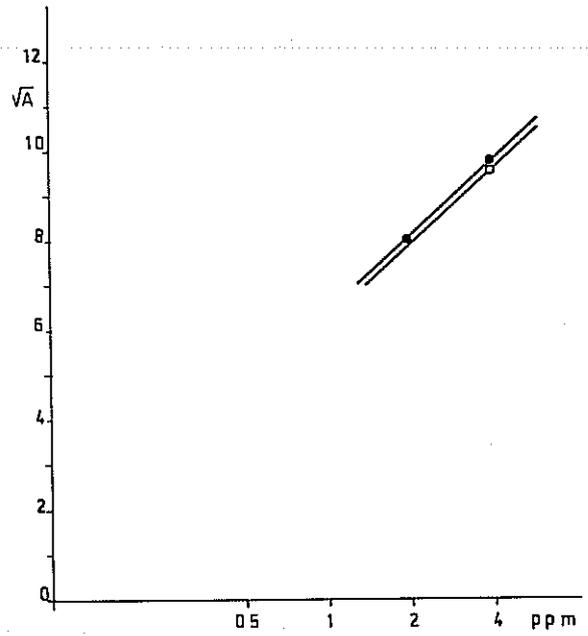
TABELLA N. 4 - Confronto fra i metodi di cromatografia su strato sottile, cromatografia su carta e potenziometro nella rivelazione quantitativa e qualitativa di insetticidi aggiunti in estratti di insalata

FITOFARMACI	Quantità di prodotto aggiunto allo omogenato (ppm)	Quantità di prodotto rilevata					
		Crom. su carta		Crom. su str. sott.		Potenziometro	
		ppm	Errore %	ppm	Errore %	ppm	Errore %
Prodotti impiegati singolarmente							
a) Carbaril	8,00	n.r.	n.r.	6,89	— 13,80	5,67	— 29,10
b) Fosfamidone	4,00	2,75	— 31,02	4,23	+ 5,70	3,50	— 12,40
c) Diclorvos	4,00	3,72	— 6,79	3,83	— 4,07	3,49	— 12,65
d) Azinfos-metile	4,00	6,91	+ 72,90	3,75	— 6,06	3,46	— 13,30
e) Parathion etile	2,00	1,47	— 26,08	2,04	+ 2,29	0,91	— 54,20
Prodotti impiegati in miscela							
Carbaril	4,00			4,00	0,00		
Fosfamidone	2,00			2,62	+ 31,00		
Diclorvos	2,00			3,12	+ 56,40		
Azinfos-metile	4,00			3,41	— 14,60		
Parathion etile	1,00			1,27	+ 27,30		

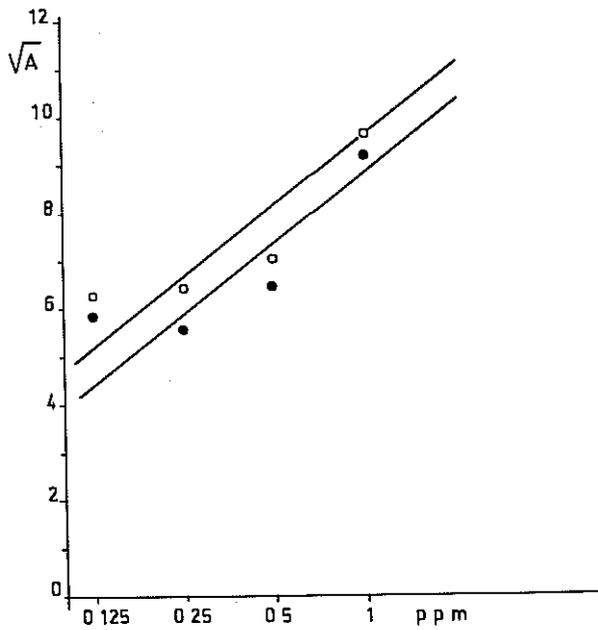
FOSFAMIDONE



DICLORVOS



AZINFOS-METILE



PARATHION

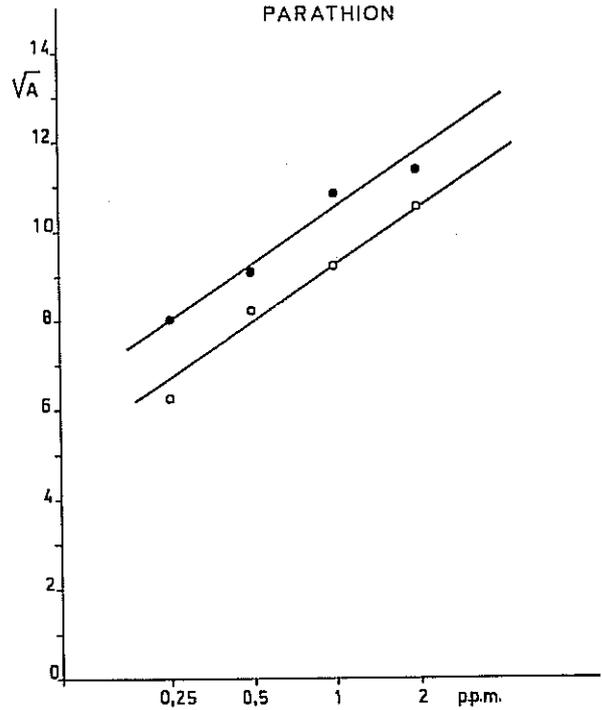
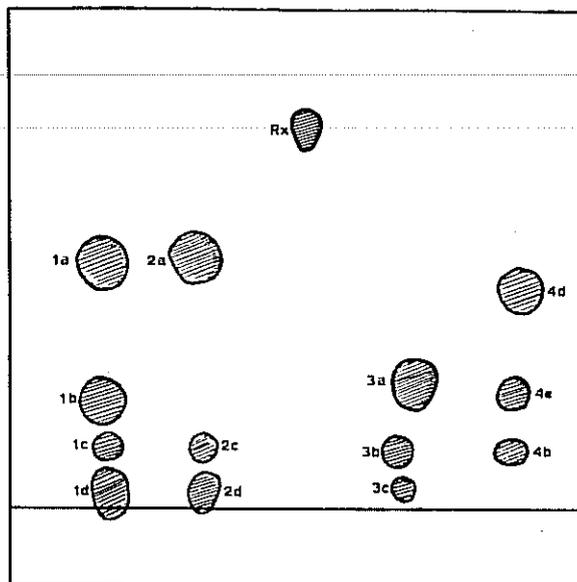


Gráfico N. 4 - Rette di regressione ottenute con i risultati riportati in Tabella N. 4 rilevati in cromatografia su carta.

\sqrt{A} = radice quadrata dell'area di inibizione

• Standard

◦ Estratto



Cromatogramma n. 1 - Identificazione e separazione cromatografica di alcune miscele di insetticidi.

Prodotti ossidati:

- 1-a Diclorvos
- 1-b Parathion etile
- 1-c Carbaril
- 1-d Fosfamidone + Azinfos metile
- 3-a Diazinone
- 3-b Mevinfos
- 3-c Parathion metile

Prodotti non ossidati:

- 2-a Diclorvos
- 2-c Carbaril
- 2-d Fosfamidone
- 4-d Isolano (1° metabolita)
- 4-e Isolano (2° metabolita)
- 4-b Mevinfos

dai «limiti di tolleranza» stabiliti dalla C.E.E. e dalla F.A.O.-O.M.S.

Inoltre sono stati messi a confronto i metodi d'analisi colinesterasici della cromatografia su strato sottile, della cromatografia su carta ed il metodo potenziometrico, allo scopo di controllare quale di queste tecniche consentisse la migliore determinazione quantitativa e qualitativa di alcuni insetticidi. Essi erano: Carbaril, Fosfamidone, Diclorvos, Azinfos-metile e Parathion etile analizzati sia singolarmente che in miscela ag-

giungendoli, in quantità note, ad estratti di insalata preventivamente purificati. Le analisi dei campioni così predisposti sono state effettuate con ciascuno dei suddetti metodi.

I risultati dei rilievi, sottoposti ad analisi statistica e dal successivo dosaggio della quantità di residuo presente nell'estratto con il metodo del dosaggio a 4 o 6 punti descritto da Lison (1961), sono riportati in Tab. 4.

Tali risultati consentono di dedurre che:

— la C.S.S. ha permesso di identificare qualitativamente i singoli principi attivi anche se miscelati, mentre ciò non è stato possibile con la cromatografia su carta.

— Per quanto concerne l'analisi quantitativa si rileva che, per i prodotti impiegati singolarmente, la C.S.S. ha consentito di effettuare una buona valutazione del dosaggio, essendo contenuto l'errore analitico entro valori compresi fra il 2,29% ed il 6,06% per Parathion etile, Diclorvos, Fosfamidone ed Azinfos metile ed il 13,80% per il Carbaril. Tale tecnica non consente, però, un dosaggio altrettanto soddisfacente allorché si procede all'analisi quantitativa di singoli prodotti miscelati. Infatti l'errore in tale caso presenta una variabilità notevole, compresa fra il 14,60% (per l'Azinfos metile) ed il 56,40% (per il Diclorvos) mentre è da ritenere del tutto occasionale la coincidenza del risultato analitico del Carbaril.

— La tecnica di indagine potenziometrica ha consentito di pervenire a risultati analitici affetti da un errore compreso fra il 13% ed il 29%; per il Parathion etile si riscontra invece un errore del 54,20%.

— La cromatografia su carta ha fornito risultati molto disformi e affetti da un errore complessivamente molto elevato, e variabile da fitofarmaco a fitofarmaco.

I grafici allegati (N. 2) mettono in evidenza la particolare ripetibilità, la linearità ed il parallelismo quasi perfetto che si è rilevato nelle prove ripetute in C.S.S., a differenza degli altri due metodi per i quali tali caratteristiche analitiche sono molto meno soddisfacenti (v. grafici n. 3 e 4).

A conclusione delle indagini svolte si può affermare che il metodo analitico di rivelazione colinesterasica su strato sottile può costituire una ottima via per l'individuazione qualitativa e semiquantitativa delle sostanze

insetticide derivate dell'acido fosforico e dell'acido carbammico, comunemente impiegate nella difesa fitosanitaria ed i cui residui possono essere presenti sulle diverse derrate ortofrutticole.

BIBLIOGRAFIA

- CESARI A., OLMO E., GUIATI B. (1967), *Utilizzazione della reazione colinesterasica «in vitro» per l'individuazione e la separazione di residui di insetticidi*, Atti delle «Giornate Fitopatologiche 1967», 129-132.
- EL REFAI A., HOPKIN T. L. (1965), *Thin-layer chromatography and cholinesterase detection of several phosphorothiono insecticides and their oxygen analogs*, «J. Agr. Food. Chem.», 13, 477-481.
- FOSCHI S., CESARI A., OLMO E. (1967), *Metodi biologici per la rilevazione di residui di antiparassitari*, Atti delle «Giornate Fitopatologiche, 1967», 91-104.
- KOVACS A., RIGHI R. (1963), *Fattori ambientali ed attività in vitro di diversi parathion*, Atti delle «Giornate Fitopatologiche 1963», 185-189.
- LISON L. (1961), *Statistica applicata alla biologia sperimentale*, «Ambrosiana», Milano.
- MENN J. J., McBAIN J. B. (1966), *Detection of cholinesterase-inhibiting insecticide chemicals and pharmaceutical alkaloids on thin-layer chromatograms*, «Nature», 209, n. 5030, 1351-1352.

RIASSUNTO

Gli autori, nell'ambito delle indagini intraprese per la messa a punto di una serie di analisi bio-

logiche e biochimiche per l'individuazione di fitofarmaci presenti nelle derrate ortofrutticole, riferiscono sulla metodologia dell'applicazione dell'enzima colinesterasico (ChE) in cromatografia su strato sottile (C.S.S.). Vengono indicati i risultati delle ricerche svolte per saggiare la sensibilità di tale enzima agli organofosfati ed ai carbammati insetticidi i cui valori sono sempre inferiori ai «limiti di tolleranza» stabiliti dalle due organizzazioni C.E.E. e F.A.O.

In un confronto fra tre metodi di analisi con rivelazione colinesterasica e cioè «cromatografia su strato sottile» (C.S.S.) «cromatografia su carta» e «metodo potenziometrico» i risultati ottenuti stanno ad indicare che la C.S.S. denota caratteristiche di rapidità, sensibilità e semplicità di esecuzione superiori a quelle delle altre metodologie.

SUMMARY

In the context of the researches undertaken with the object of perfecting a series of biological and biochemical analyses for the determination of the pesticides which are present in fruits and vegetables, the method of application of cholinesterase enzyme (ChE) in thin layer chromatography (T.L.C.) is described. The authors report the results obtained from the researches conducted to test the sensitivity of this enzyme to organophosphate and carbamate insecticides whose values were always lower than the «limits of tolerance» established by the C.E.E. and F.A.O. organizations.

The results of a comparison between the three methods of analysis, that is, «thin layer chromatography» (T.L.C.), «paper chromatography» and «potentiometric method», showed that T.L.C. is much more rapid, sensitive and easy to carry out than other methods mentioned above.